

بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی میوه بلوط (*Quercus branti*) بر روی لیستریا منوسیتوژنز و انتروکوکوس فکالیس در شرایط آزمایشگاهی

سیف اله برجیان بروجنی^۱، الهام کاوه باباحیدری^۱، سیف اله مرتضایی^۲، مسعود برجیان بروجنی^۳،
مجید ولیدی^{*۲}

گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ دانشجو، کمیته تحقیقات دانشجویی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۹

چکیده:

زمینه و هدف: انجام تحقیقات بنیادی بر روی گیاهان به منظور تشخیص عوامل موثره دارویی آن ها و تأثیر بر عوامل بیماریزای بیولوژیک، در مراکز تحقیقات گیاهان دارویی در سراسر جهان و به ویژه کشور ما ایران در سال های اخیر رو به افزایش می باشد این مطالعه با هدف تعیین میزان تانن موجود در عصاره میوه بلوط (*Quercus branti*) و بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی این عصاره بر روی ۲ باکتری بیماری زای انسانی لیستریا منوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) و انتروکوکوس فکالیس (*Enterococcus faecalis*) انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه بنیادی- تجربی، پس از تهیه میوه بلوط ایرانی و خشکاندن و تهیه پودر آن در شرایط مناسب با استفاده از اتانول، عصاره هیدروالکلی آن به روش خیساندن و پرکولاسیون تهیه گردید و هم چنین میزان تانن آن بر اساس روش رنگ سنجی و توسط معرف فولین- دنیس اندازه گیری شد؛ سپس اثرات ضد باکتریایی عصاره این گیاه با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) آن و با استفاده از روش روش میکروبراث دایلوژن مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: براساس نتایج این تحقیق، مقدار تانن در هر گرم عصاره خشک بلوط $123/5 \pm 3/5$ میلی گرم و میزان MIC و MBC عصاره برای لیستریا منوسیتوژنز به ترتیب ۲ و ۸ میلی گرم بر میلی لیتر و برای انتروکوکوس فکالیس به ترتیب ۲ و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد.

نتیجه گیری: عصاره بلوط ایرانی با دارا بودن ماده ضد میکروبی تانن دارای اثر مهارکنندگی رشد و کشندگی بر روی دو باکتری بیماری زای انسانی لیستریا منوسیتوژنز و انتروکوکوس فکالیس بوده است.

واژه های کلیدی: اثرات ضد باکتریایی، میوه بلوط، لیستریا منوسیتوژنز، انتروکوکوس فکالیس.

مقدمه:

درجه سانتی گراد و غلظت بالای نمک به خوبی رشد کند، این باکتری انتشار جهانی داشته و در حیوانات اهلی، گیاهان و خاک یافت می شود و در پی مصرف گوشت خوب پخته نشده، شیر غیر پاستوریزه یا سبزیجات خام به انسان منتقل می شود. بیماری زایی لیستریا به توانایی آن در تهاجم به سلول های بیگانه خوار تک هسته ای و بقا در این سلول ها بستگی دارد. لیستریا باعث سقط جنین،

انجام تحقیقات بنیادی بر روی گیاهان به منظور تشخیص عوامل موثره دارویی آن ها و تأثیر بر عوامل بیماری زای بیولوژیک، در مراکز تحقیقات گیاهان دارویی در سراسر جهان و به ویژه کشور ما ایران در سال های اخیر رو به افزایش می باشد. لیستریا منوسیتوژنز یک باسیل کوچک، گرم مثبت و بی هوازی اختیاری است که قادر است در طیف مختلف دمایی ۱ تا ۴۵

زایمان زودرس و سپس در ماه های آخر حاملگی و تا چند ماه پس از زایمان، و همچنین منتزیت و گاستروانتریت می شود (۱). پنی سیلین ها، آمینوگلیکوزیدها و ماکرولیدها، آنتی بیوتیک های موثر بر لیستریا منوسیتوژنز معرفی شده اند و گرچه مقاومت دارویی در این باکتری چندان شایع نبوده است ولیکن سویه هایی از این باکتری با مقاومت به این آنتی بیوتیک های نیز دیده شده است (۲). استرپتوکوک های گروه D شامل انتروکوک ها مثل انتروکوکوس فکالیس و انتروکوک فاسیوم می باشند (۱). انتروکوک ها نیز چهارمین عامل عفونت های بیمارستانی و سومین عامل باکتریایی و یکی از عوامل شایع عفونت های ادراری می باشند. این باکتری ها ارگانیسم های بسیار متنوعی هستند و می توانند در محیط و یا روی دست های پرسنل بیمارستان زنده بمانند. انتروکوک های مقاوم به آنتی بیوتیک ها می توانند، در دستگاه گوارش بیماران و پرسنل درمانی کلونیزه شوند و یک منبع دائمی را برای گسترش داخل بیمارستانی فراهم آورند. مقاومت انتروکوک به عوامل ضد میکروبی به پنی سیلین، سفالوسپورین ها و آمینوگلیکوزیدها مورد توجه و قابل اهمیت می باشد (۳). از طرفی بلوط ایرانی (*Quercus branti*) جزء درختان بزرگ با ارتفاع حدود ۲۰ متر و با تاج کروی بزرگ هستند، برگ های آن عموماً یکنواخت و تخم مرغی شکل با حاشیه ای دندانه دار است. میوه آن بیضی شکل بوده و در پیاله سفید رنگ مخملی و مخروطی شکل جای گرفته است (۴). قسمت های مختلف این گیاه دارای مصارف درمانی گوناگونی است. بلوط در درمان خونریزی های گوناگون، زخم معده، دیسانتري، بواسیر، رفع التهاب لوزه و ورم حنجره به کار می رود. از پوست آن به عنوان پادزهری برای مسمومیت ناشی از آلکالوئیدها استفاده می شود. در درمان برخی بیماری های پوستی مثل اگزما و برص موثر بوده، در رفع التهاب گلو و همچنین درمان پولیپ های بینی هم کاربرد دارد (۵). میوه بلوط علاوه بر ترکیبات تغذیه ای حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فعال بیولوژیکی

است که از آن جمله می توان به اسیدگالیک، تانن، الاژیک اسید و مشتقات گالویل یا هگزا هیدروکسی دی فنوئیل اشاره کرد که تمامی این ترکیبات دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند (۶). تانن یکی از مهم ترین مواد موثره این گیاه با اثرات قابض و ضد عفونی کننده است که این امر به علت جذب آب و رسوب پروتئین ها صورت می گیرد (۷). به طور کلی تانن ها به ۲ دسته کندانه و قابل هیدرولیز تقسیم می شوند که از دسته اول به کاتشین و اپی کاتشین و از دسته دوم این ترکیبات به اسید گالیک و اسید الاژیک می توان اشاره کرد (۸). عمل ضد میکروبی تانن ها ممکن است با توانایی آن ها برای غیر فعال کردن چسبندگی میکروبی، آنزیم و پروتئین های ناقل پوشش سلولی مرتبط باشد و به نظر می رسد که فعالیت ضد میکروبی انواع بلوط به مقدار تانن موجود در عصاره های گیاه بستگی دارد (۹)؛ بنابراین با توجه به اهمیت بیماری زایی لیستریا منوسیتوژنز در ایجاد گاستروانتریت و انتروکوکوس فکالیس در ایجاد عفونت های بیمارستانی، این مطالعه با هدف تعیین میزان تانن موجود در عصاره میوه بلوط ایرانی و بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره هیدرو الکلی این میوه بر روی لیستریا منوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*) و انتروکوکوس فکالیس (*Enterococcus faecalis*) انجام شده است.

روش بررسی:

در این مطالعه بنیادی- تجربی، میوه تازه بلوط ایرانی پس از جمع آوری، تحت شرایط مناسب خشک و تبدیل به پودر گردید و عملیات عصاره گیری به روش خیساندن و پرکولاسیون توسط اتانول ۸۰٪ انجام شد (۱۰). جهت اندازه گیری مقدار تانن عصاره بلوط از روش فولین دنیز استفاده و جهت افزایش دقت، آزمایش در ۳ نوبت تکرار شد (۱۱).

باکتری های مورد مطالعه در این مطالعه عبارت بودند از لیستریا منوسیتوژنز سویه PTCC1163 و

انتروکوکوس فکاليس سویه ATCC29212 که به ترتیب از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران و از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و کشت اولیه آن ها بر روی محیط کشت بلاد آگار، مولر هیتون آگار و مولر هیتون براث انجام شد، سپس از کلنی های حاصله، سوسپانسیون معادل کدورت نیم مک فارلند از هر کدام از باکتری ها را تهیه نمودیم و جهت تعیین حساسیت یا مقاومت باکتری های مورد مطالعه به هر یک از غلظت های عصاره، طبق روش انتشار دیسک (Disk diffusion test) متد Kirby Bauer، هر یک از باکتری ها به طور جداگانه بر روی محیط های کشت مولر هیتون آگار و بلاد آگار به روش گستراندن (spreading) کشت داده شدند، سپس با رعایت دقت و تا حد ممکن حفظ شرایط استریل، بر روی هر یک از محیط های حاوی باکتری، دیسک های بلانک استریل شده را قرار داده و به هر دیسک ۵۰ میکرولیتر از رقت های مختلف عصاره (۰/۰۱۵ تا ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر) را اضافه نموده و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دادیم و نتایج آزمایشات، بر اساس اندازه قطر هاله عدم رشد در اطراف هر دیسک ثبت شد. از دیسک های آنتی بیوتیک آمپی سیلین و جنتامایسین نیز به عنوان شاهد مثبت و منفی حساسیت، به ترتیب برای باکتری های لیستریا منوسیتوزنز و انتروکوکوس فکاليس استفاده شد (۱۲). جهت تعیین حداقل غلظت باز دارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره بلوط بر روی باکتری های مورد مطالعه، ابتدا روش میکروبراث دایلوژن طبق استانداردهای (CLSI= Clinical Laboratory Standard Institute, 2006, M7-A4, USA) به کار رفت که بر اساس نتایج تحقیقات مشابهی، با حل نمودن عصاره میوه بلوط ایرانی در دی متیل سولفید اکساید (DMSO) ۲۰٪ در آب مقطر استریل، محلولی با غلظت ۶۴ میلی گرم در میلی لیتر تهیه و این محلول با کمک فیلتر میلی پور سرنگی (۰/۴۵ میکرومتر) استریل شد (۱۵-۱۳). با استفاده از میکروپلیت های الیزای ۹۶ چاهکی، در

چاهک اول هر ردیف ۲۰۰ میکرولیتر از استوک اولیه عصاره بلوط و به چاهک های دیگر، ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هیتون براث اضافه شد، سپس سریال رقت تهیه شد. پس از آن از سوسپانسیون های میکروبی با کدورت ۰/۵ مک فارلند به هر یک از چاهک های میکروپلیت اضافه شد. با این عمل غلظت های جداگانه ۳۲ میلی گرم در میلی لیتر تا ۱۵ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره مخلوط با باکتری تهیه شد. در کنار سریال رقت ها ۲ چاهک جهت کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شد. کنترل مثبت شامل (محیط کشت + باکتری + حلال ۲۰٪ DMSO) و کنترل منفی شامل (محیط کشت فاقد باکتری) بودند. در نهایت میکروپلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. ضمن استفاده از روش میکروپلیت، از روش لوله ای نیز با تهیه سریال دایلوژن از مخلوط محلول های عصاره و محیط کشت مایع مولر هیتون براث و در حجم ۱ میلی لیتر در هر یک از ۱۲ لوله، آزمایشات تحقیق ادامه یافت و از غلظت های کم به زیاد، آخرین رقتی در لوله های آزمایش و همچنین در چاهک های میکروپلیت که کدورتی در آن مشاهده نشد. به عنوان MIC عصاره برای هر یک از باکتری های مورد تحقیق در نظر گرفته و ثبت گردید (بررسی کدورت در لوله های آزمایش گرچه با چشم قابل بررسی بود ولیکن با استفاده از ELISA reader مدل ۲۱۰۰ USAstatfax و در طول موج ۶۳۰ نانومتر نیز در میکروپلیت ها انجام شد). به منظور تعیین MBC عصاره بر باکتری های فوق، از تمام چاهک ها و همچنین لوله های بدون کدورت و به طور جداگانه ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط های کشت بلاد آگار کشت داده شد و آخرین رقتی از عصاره که قادر به کشتن ۹۹٪ باکتری ها گردید (که باکتری در آن غلظت از عصاره رشد نکرده بود). به عنوان MBC عصاره برای آن باکتری منظور گردید. نتایج و داده های تحقیق براساس اهداف پژوهش و شرایط مطالعه، طبق قوانین آمار توصیفی، دسته بندی و توصیف قرار گرفتند.

یافته ها:

این تحقیق نشان داد که در هر گرم از عصاره خشک میوه بلوط ایرانی $123/5 \pm 3/5$ میلی گرم تانن وجود داشته است. در تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) و بررسی حساسیت به محدوده غلظتی (۳۲-۰/۱۵) میلی گرم بر میلی لیتر) به روش دیسک دیفیوژن در ۳ بار تکرار نشان داده شد که میزان MIC این عصاره بر هر ۲ باکتری لیستریا منوسیتوژنز و انتروکوکوس فکالیس برابر ۲ میلی گرم بر میلی لیتر و MBC آن برای لیستریا منوسیتوژنز برابر ۸ میلی گرم بر میلی لیتر و برای انتروکوکوس فکالیس برابر ۴ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است که دلالت بر این دارد که عصاره بلوط ایرانی بر روی باکتری های مورد بررسی، یعنی لیستریا منوسیتوژنز و انتروکوکوس فکالیس اثرات مهارکنندگی رشد مساوی داشته، ولیکن تأثیر کشندگی آن بر روی

انتروکوکوس فکالیس بیش تر از لیستریا منوسیتوژنز بوده است (جدول شماره ۱ و ۲). لازم به توضیح است، با توجه به تعریف علمی حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشندگی مواد بر روی میکروارگانیسم ها، در این مطالعه نیز کم ترین غلظتی از عصاره که در نتیجه ۳ نوبت آزمایش باعث مهار رشد یا عدم کامل رشد (کشته شدن) باکتری های مورد تحقیق شده است، به عنوان MIC و MBC منظور گردید. در بررسی تعیین حساسیت لیستریا منوسیتوژنز به محدوده غلظتی (۳۲-۰/۱۵) میلی گرم بر میلی لیتر) عصاره میوه بلوط با روش دیسک دیفیوژن، غلظت های ۱۶ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره بالاترین اثر ضد باکتریایی مشاهده شد. در مورد انتروکوکوس فکالیس در غلظت های ۸، ۱۶ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره بالاترین اثر ضد باکتریایی مشاهده شد (جدول شماره ۳ و ۴).

جدول شماره ۱: نتایج تعیین حداقل غلظت های مهارکنندگی رشد (MIC) و کشندگی (MBC) عصاره میوه بلوط ایرانی

بر روی لیستریا منوسیتوژنز PTCC1163

نوبت آزمایش	تکرار اول در	تکرار دوم در	تکرار سوم در	کم ترین مقدار
میکرو پلیت	میکرو پلیت	لوله آزمایش	MIC و MBC	
حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) میلی گرم بر میلی لیتر	۴	۲	۲	۲
حداقل غلظت کشندگی (MBC) میلی گرم بر میلی لیتر	۸	۸	۸	۸

جدول شماره ۲: نتایج تعیین حداقل غلظت های مهارکنندگی رشد (MIC) و کشندگی (MBC) عصاره میوه بلوط

ایرانی بر روی انترو کوکوس فکالیس ATCC29212

نوبت آزمایش	تکرار اول در	تکرار دوم در	تکرار سوم در	کم ترین مقدار
میکرو پلیت	میکرو پلیت	لوله آزمایش	MIC و MBC	
حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) میلی گرم بر میلی لیتر	۲	۲	۲	۲
حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره بر باکتری (میلی گرم بر میلی لیتر)	۴	۸	۴	۴

جدول شماره ۳: نتایج حساسیت لستریا منوسیتوز در مقابل غلظت های مختلف عصاره بلوط و دیسک های جتتامایسین و آمپی سیلین به روش دیسک دیفیوژن

غلظت عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر)	۳۲	۱۶	۸	۴	۲	۱	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۱۵	دیسک جتتامایسین	دیسک آمپی سیلین
نتایج تکرار اول	S	S	rS	rS	R	R	R	R	R	R	R	R	rS	rS
نتایج تکرار دوم	S	S	S	rS	R	R	R	R	R	R	R	R	rS	rS
نتایج تکرار سوم	S	S	rS	rS	R	R	R	R	R	R	R	R	rS	rS

$S=Sensitive$ (حساس با قطر هاله عدم رشد باکتری مساوی و بیش تر از ۱/۵ سانتی متر)؛ $R=Resistant$ (مقاوم با قطر هاله عدم رشد باکتری مساوی و کم تر از ۱ سانتی متر)؛ $rS=Relatively sensitive$ (نیمه حساس با قطر هاله عدم رشد باکتری بین ۱ تا ۱/۴۹ سانتی متر).

جدول شماره ۴: نتایج حساسیت انتروکوکوس فکالیز در مقابل غلظت های مختلف عصاره بلوط و دیسک های جتتامایسین، آمپی سیلین و وانکومایسین به روش دیسک دیفیوژن

غلظت عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر)	۳۲	۱۶	۸	۴	۲	۱	۰/۵	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۱۵	دیسک وانکومایسین	دیسک آمپی سیلین	دیسک جتتامایسین
نتایج تکرار اول	S	S	S	rS	rS	R	R	R	R	R	R	R	rS	R	rS
نتایج تکرار دوم	S	S	S	rS	rS	R	R	R	R	R	R	R	rS	R	rS
نتایج تکرار سوم	S	S	S	rS	rS	R	R	R	R	R	R	R	rS	R	rS

$S=Sensitive$ (حساس با قطر هاله عدم رشد باکتری مساوی و بیش تر از ۱/۵ سانتی متر)؛ $R=Resistant$ (مقاوم با قطر هاله عدم رشد باکتری مساوی و کم تر از ۱ سانتی متر)؛ $rS=Relatively sensitive$ (نیمه حساس با قطر هاله عدم رشد باکتری بین ۱ تا ۱/۵ سانتی متر).

بحث:

میکروبی، آنزیم و پروتئین های ناقل پوشش سلولی مرتبط بوده و به نظر می رسد که فعالیت ضد میکروبی انواع بلوط به مقدار تانن موجود در عصاره های گیاه بستگی داشته باشد (۷،۹). در مطالعه ای تحت عنوان ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی میوه بلوط به روش انتشار دیسک توسط ابراهیمی و همکاران، نشان داده شده است که بلوط ایرانی دارای ترکیباتی با خصوصیات ضد باکتریایی است و اثر عصاره بر روی باکتری وابسته به غلظت مواد ضد میکروبی آن بوده و همراه با افزایش غلظت عصاره

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داده است عصاره میوه بلوط ایرانی با دارا بودن مقادیر کافی تانن و مشتقات مربوطه، روی ۲ باکتری لستریا منوسیتوز و انتروکوکوس فکالیز که ۲ باکتری بیماری زای شایع انسانی می باشند، در شرایط آزمایشگاهی اثر خوبی داشته است. از آن جایی که تانن یکی از مهم ترین مواد موثره این گیاه با اثرات قابض و ضد عفونی کننده است که این امر به علت جذب آب و رسوب پروتئین ها صورت می گیرد و عمل ضد میکروبی تانن ها ممکن است با توانایی آن ها برای غیر فعال کردن چسبندگی

قطر هاله عدم رشد اطراف باکتری نیز افزایش یافته است (۱۴). در مطالعه ای که تاران و همکاران، اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره های هیدروالکلی و اتری بلوط را مورد بررسی قرار داده اند، مشابه به نتایج مطالعه ما مشخص شده که هر ۲ نوع عصاره روی سویه های میکروبی مورد بررسی دارای اثر ضد میکروبی بوده است، ولیکن MIC عصاره هیدروالکلی بلوط در مقابل باکتری های گرم مثبتی نظیر باسیلوس سوبتیلیس برابر ۳۲ و در مقابل استافیلوکوکوس برابر ۳۳/۲۱۳ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است که علت تفاوت مقادیر حاصل از تحقیق ما با مورد فوق و سایر تحقیقات اشاره شده زیر، می تواند ناشی از تفاوت نوع و گونه باکتری ها و قارچ های مورد تحقیقات مختلف بوده باشد (۱۵)؛ همچنین در مطالعه ای که توسط جلالی و همکاران که به منظور بررسی اثرات عصاره های هیدروالکلی تعدادی از گیاهان دارویی بر روی لیستریا منوسیتوژنز انجام شده است، اعلام نموده اند که عصاره های آویشن، بابونه، رزماری و مریم گلی روی این باکتری موثر نبوده، ولی عصاره اکالیپتوس با MIC ۲۵/۳۱ میکروگرم و MBC ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی این باکتری موثر بوده است که این موضوع نشان دهنده تفاوت مواد ضد میکروبی انواع داروهای گیاهی و همچنین تفاوت حساسیت انواع مختلف میکروارگانیسم ها با هم دیگر باشد (۱۶). Khouzami و همکاران نیز اثر آنتی باکتریال عصاره بلوط را به روش دیسک دیفیوژن بر روی ۱۱ گونه باکتری جدا شده از بیمارستان مورد مطالعه قرار دادند، نتایج مطالعه آن ها نشان داد که عصاره متانولی بلوط بر روی سیتروباکتر براکی، پروتئوس میرابلیس و سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) و حساس به متی سیلین (MSSA) اثر ضد باکتری دارد (۱۷). خسروی در مطالعه ای با عنوان ارزیابی فعالیت آنتی باکتریال عصاره بلوط بر روی تعدادی از باکتری های گرم منفی نشان داد که اثر آنتی باکتریال عصاره روی پروتئوس میرابلیس و

اشرشیاکلی چشمگیر بوده و مستقیماً وابسته به غلظت می باشد، اما تأثیری بر روی شینگلا فلکسنری ندارد (۷). در تحقیقی که توسط Hayouni و همکاران انجام شد، اثر مهاری غلظت ۳۰۰ میکروگرم/ دیسک عصاره آبی میوه بلوط بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی گزارش گردید (۱۰). در مطالعه صفری و همکاران که اثر عصاره متانولی و اتانولی بلوط به روش دیسک دیفیوژن بر روی سالمونلا تیفی، پروتئوس میرابلیس، شینگلا دیسانتری، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، بروسلا ملی تنسیس و ... مورد بررسی قرار گرفته، نشان داده شده است که غلظت های مختلف عصاره اثر ضد باکتریایی بر روی باکتری های مورد مطالعه داشته اند که این نتایج نیز تأیید کننده نتایج مطالعه ما می باشد (۱۸). بررسی مشابه انجام شده توسط مریم قادری قهفرخی و همکاران نیز حاکی از اثر ضد باکتریایی عصاره ۲ واریته مختلف بلوط بر چند جنس و گونه از باکتری های مختلف عامل بیماری ناشی از مصرف مواد غذایی بوده و میزان MBC این ۲ عصاره را بر روی باکتری های مختلف مورد تحقیقی خویش بین ۱/۲۵ تا ۵ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش نموده اند و این مقادیر با مقادیر MBC حاصل از تحقیق ما مشابهت نزدیک دارد (۱۹). در تحقیقی که توسط علی کریمی و همکاران در دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و با بررسی اثر غلظت های مختلف عصاره بلوط ایرانی بر مراحل قبل و بعد از اتصال ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ به سلول هدف و همچنین بررسی غلظت سمیت آن بر سلول هدف انجام گرفته، اعلام شده است که این عصاره در غلظت ۱/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر در قبل از اتصال ویروس به سلول موثر بوده ولیکن در این محدوده از غلظت سمیتی برای سلول نداشته است (۲۰). در مطالعه قاسمی پیربلوطی و همکاران اثر ضد باکتریایی عصاره *Quercus branti Lindley* به روش دیسک دیفیوژن بر روی باکتری های کلبسیلا پنومونیه، اشرشیا کلی H₇: O₁₅V، سودوموناس آنروژینوزا، یرسینیا انتروکولتیکا، کمپیلوباکتر ژژونی، باسیلوس سرئوس و

لستیریا منوسیتوژنز بررسی شد، ولی اثر ضد باکتریایی مشاهده نشد (۲۱).

میزان حداقل غلظت باز دارندگی رشد (MIC) و کشندگی (MBC) این عصاره، همانند تفاوت تأثیر آنتی بیوتیک ها بر میکروارگانیسم های مختلف، بر روی این ۲ باکتری نیز متفاوت بوده است.

نتیجه گیری:

با توجه به موارد ذکر شده و نتایج حاصله از این تحقیق می توان نتیجه گیری کرد که عصاره هیدروالکلی بلوط همانند تأثیر بر سایر میکروارگانیسم ها و حتی ویروس ها، دارای اثر باز دارندگی رشد و همچنین اثر کشندگی بر روی لستیریا منوسیتوژنز و انتروکوکوس فکالیس که از باکتری های مهم بیماری زا هستند، بوده است ولیکن احتمالاً به علت تفاوت ساختار تشریحی و فیزیولوژیک باکتری ها یا میکروارگانیسم های مختلف،

تشکر و قدردانی:

این مطالعه منتج از طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با شماره طرح ۱۳۹۱-۱۱-۱۳۱۳ می باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد به دلیل تقبل هزینه انجام طرح و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی جهت همکاری در انجام طرح تشکر به عمل می آید.

منابع:

1. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. In: Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 26th ed. USA: The McGraw-Hill Companies; 2013: 187-98.
2. Mahon C, Lehman D, Manuselis G. In: Mahon's Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. USA: Saunders Company; 2011: 111-25 .
3. Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. The streptococci: In: Murray medical microbiology. 7th ed. USA: Saunders Company; 2013: 188-204.
4. Sabeti H. In: Forests, trees and shrubs of Iran. Tehran: Yazd University Pub; 1995: 575-84.
5. Zargari A. Medicinal Plant. 5th ed. Tehran: Tehran University Pub; 1991. 43-4 and 63-72 .
6. Rakić S, Petrović S, Kukić J, Jadranin M, Tešević V, Povrenović D, et al. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. Food Chemy. 2007; 104(2): 830-4.
7. Khosravi AD, Behzadi A. Evaluation of the antibacterial activity of the seed hull of *Quercus branti* on some gram negative bacteria. Pak J Med Sci. 2006; 22(4): 429-32.
8. Harborne JB, Baxter H: Chemical dictionary of economic plants. New York: Wiley Editorial Office; 2001: 109-228.
9. Zargari A. Pharmaceutical plants. 2nd ed. Tehran: Amir Kabir Pub; 1988. 563-5 .
10. Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Food Chemy. 2007; 105(3): 1126-34.
11. Price ML, Butler LG. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. J Agric Food Chem. 1977; 25(6): 1268-73.
12. Mackie TJ. Mackie & McCartney practical medical microbiology. 13th ed: Michigan: Churchill Livingstone; 1989.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 12th Informational Supplement. M100-S24. 2014. Available from: http://shop.clsi.org/c.1253739/site/Sample_pdf/M100S25_sample.pdf.

14. Ebrahimi A, Khayami M, Nejati V. Evaluation of the antibacterial activity of *Quercus persica* Jaub & Spach fruit's hidroalcoholic extract in disc diffusion method. *J Med Plant*. 2010; 1(33): 26-34.
15. Taran M, Azizi E, Sharifi M. Antibacterial and antifungal activity of hydroacoholic and etheric extracts of *Quercus branti*. *J Microb Biotech*. 2010; 2 (4): 7-12.
16. Jalali M, Abedi D, Ghasemi Dehkordi N, Charmahali A. Evaluation of antibacterial activity of ethanol extracts of some medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2006; 8(3.): 225-33.
17. Khouzami L, Mroueh M, Daher CF. The role of methanolic extract of *Quercus infectoria bark* in lipemia, glycemia, gastric ulcer and bacterial growth. *J Med Plants Res*. 2009; 2(4): 224-30.
18. Safary A, Motamedi H, Maleki S, Seyyednejad S. A preliminary study on the antibacterial activity of *Quercus branti* against bacterial pathogens, particularly enteric pathogens. *Int J Bot*. 2009; 5(2): 176-80 .
19. Ghaderi GM, Sadeghi MA, Alami M, Khomeiri M, Mamashloo S. Evaluation of antimicrobial activity of the ethanolic extracts from *Q. branti* and *Q. castaneifolia* fruit against some food-borne pathogens by microdilution method. *J Food Technol Nutr*. 9(1): 2012: 81-94.
20. Karimi A, Moradi M, Saedi M, Salimzadeh L, Rafieian M. The Inhibitory Effect of *Quercus Persica* L Extract on Herpes Simplex Virus-1 Replication on Baby Hamster Kidney Cells. *Armaghane-danesh*. 2011; 16(2): 141-9.
21. Pirbalouti AG, Malekpoor F, Hamedi B. Ethnobotany and antimicrobial activity of medicinal plants of Bakhtiari Zagross mountains, Iran. *J Med Plants Res*. 2012; 6(5): 675-9.

Study antibacterial effects of hydroalcoholic extract of acorn fruit's (*Quercus branti*) against *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis* in vitro

Borjian- Borujeni S¹, Kaveh Baba Heidari E¹, Mortezaei S², Borjian- Borujeni M³,
Validi M^{2*}

¹Microbiology and Immunology Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ²Student, Student Research Committee, Medicinal Plant Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ³Medicine Dept., Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 8/Sep/2015 Accepted: 19/Jan/2016

Background and aims: Fundamental research on medicinal plants for the detection of medical effective agents and effect on biological pathogens, in medicinal plant research centers all over the world, particularly Iran is increasing in recent years. This study was aimed to determine the level of tannins in acorn fruit's (*Quercus branti*) and antibacterial effects of hydroalcoholic extract against *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis*, two human pathogenic bacteria was done.

Methods: In this fundamental- experimental study, after preparation of acorn fruit's (*Quercus branti*) and drying and powder suitable conditions using ethanol, the extract was prepared by maceration and percolation methods. Tannin content was measured by colorimetric method and using of Folin-Denis' reagent. The antibacterial effects of this extract to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) was performed by broth microdilution method.

Results: Based on these results, tannin content per gram of dry extract were 123.5±3.5 mg and MIC and MBC of of *Quercus branti* extract for *Listeria monocytogenes* were respectively 2 and 8 mg/ml and for *Enterococcus faecalis* 2 and 4 mg/ml.

Conclusion: The results showed that the extract of acorn fruit's (*Quercus branti*) by having high tannins has antimicrobial, bactericidal and inhibitory effect on the human pathogen *L. monocytogenes* and *E. faecalis*.

Keywords: Antibacterial effects, Acorn fruit's (*Quercus branti*), *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*.

Cite this article as: Borjian- Borujeni S, Kaveh Baba Heidari E, Mortezaei S, Borjian- Borujeni M, Validi M. Study antibacterial effects of hydroalcoholic extract of acorn fruit's (*Quercus branti*) against *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis* in vitro. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 17(Suppl): 98-106.

***Corresponding author:**

Student, Medicinal Plant Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00989133364890, E-mail: validi543@gmail.com